

## Other Formats:

## Links:

LOCUS E03345 1007 bp DNA PAT 26-NOV-1996  
 DEFINITION DNA sequence coding for unchangeable region of dog immunoglobulin gamma chain.  
 ACCESSION E03345  
 NID g2171562  
 KEYWORDS JP 1992040894-A/1.  
 SOURCE Canis sp..  
 ORGANISM Canis sp.  
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Chordata;  
 Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Carnivora; Fissipedia; Canidae;  
 Canis.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1007)  
 AUTHORS Kazuhiko,K., Yasuyuki,E., Hiroaki,M., Yoichi,O. and Yukio,T. .  
 TITLE GENE FRAGMENT TO CODE CONSTANT REGION OF DOG IMMUNOGLOBULIN CHAIN  
 AND MOUSE X DOG CHIMERA ANTIBODY  
 JOURNAL Patent: JP 1992040894-A 1 12-FEB-1992;  
 CHEMO SERO THERAPEUT RES INST  
 COMMENT OS Canis sp. (dog)  
 PN JP 1992040894-A/1  
 PD 12-FEB-1992  
 PF 07-JUN-1990 JP 1990150673  
 PI KURUMI KAZUHIKO, EDA YASUYUKI, MAEDA HIROAKI, ONO YOICHI, PI  
 TOKIYOSHI YUKIO  
 PC C12N15/13, C07K13/00, C12N15/62, C12P21/08 // A61K39/395,  
 G01N33/531, PC G01N33/577;  
 CC strandedness: Double;  
 CC topology: Linear;  
 CC hypothetical: No;  
 CC anti-sense: No;  
 CC \*source: tissue\_type=Liver;  
 FH Key Location/Qualifiers  
 FH  
 FT CDS 1..<1007  
 FT /product='Unchangeable region of dog' FT  
 immunoglobulin gamma  
 chain'.  
 FT Location/Qualifiers  
 FEATURES source  
 1..1007  
 /organism="Canis sp."  
 /db\_xref="taxon:9616"  
 BASE COUNT 230 a 326 c 264 g 187 t  
 ORIGIN  
 1 cctccaccac ggccccctcg gttttcccac tggaccccag ctgcgggtcc acttccggct  
 61 ccacgggtggc cctggcctgc ctgggtgtca gctacttccc cgagcctgtta actgtgtcct  
 121 ggaattccgg ctccttgacc agcgggtgtgc acaccttccc gtccgacactg cagtcctcag  
 181 ggctctactc cctcagcagc atgggtgacag tgccctccag caggtggtcc agcgagacct  
 241 tcacctgcaa cgtggcccac cccggccagca aaactaaagt agacaagcca gtgcccaaaa  
 301 gagaaaaatgg aagagttcct cggccacactg attgtccaa atgcccagcc cctgaaatgc  
 361 tgggaggggcc ttccgggtttc atctttccccc cgaaacccaa ggacacccctc ttgattgccc  
 421 gaacacactga ggtcacatgt gtgggtggat atctgggacc agaagacccct gaggtgcaga  
 481 tcagctgggt cgtggacggc aagcagatgc aaacagccaa gactcagcct cgtgaggagc  
 541 agttcaatgg cacctaccgt gtggtcagtg tcctccccat tgggcaccag gactggctca  
 601 aggggaagca gttcacgtgc aaagtcaaca acaaagccct cccatccccg atcgagagga  
 661 ccatctccaa ggccagaggg caggcccatc agcccagtgt gtatgtccct cggccatccc  
 721 gggaggagtt gagcaagaac acagtcagct tgacatgcct gatcaaagac ttcttccac  
 781 ctgacattga tgtggagtgg cagagcaatg gacagcagga gcctgagagc aagtaccgca  
 841 cgaccccccgc ccagctggac gaggacgggt cctacttcct gtacagcaag ctctctgtgg  
 901 acaagagccg ctggcagcgg ggagacacct tcataatgtgc ggtgatgcat gaagctctac

④日本国特許庁(JP)

⑤特許出願公開

⑥公開特許公報(A) 平4-40894

⑦Int. Cl.

C 12 N 15/13  
C 07 K 13/00

級別記号

ZNA

序内整理番号

7731-4H  
8717-4B

⑧公開 平成4年(1992)2月12日

C 12 N 15/00  
審査請求 未請求 求求項の数 8 (全11頁)

A※

⑨発明の名称 イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびマウス×イヌキメラ抗体

⑩特願 平2-150673

⑪出願 平2(1990)6月7日

⑫発明者 来 海 和 彦 熊本県熊本市京町本丁4-60  
 ⑬発明者 江 田 康 幸 熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88  
 ⑭発明者 前 田 浩 明 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142 公团4-609  
 ⑮発明者 小 野 洋 一 熊本県熊本市清水町山室295-2 新規アパート101号  
 ⑯発明者 時 吉 幸 男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19  
 ⑰出願人 財団法人化字及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大庭668番地

⑱代理人 弁理士 简 井 知  
最終頁に続く

## 明細書

## 1. 発明の名称

イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびマウス×イヌキメラ抗体

## 2. 特許請求の範囲

(1) イヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域ポリペプチドをコードするDNA配列を有する遺伝子断片。

(2) 该定常領域ポリペプチドのC末端から最初のシスティンの近傍のアミノ酸配列が下記のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ile-Cys-Ala-

(3) 该定常領域ポリペプチドのC末端から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記の配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

(4) 该定常領域ポリペプチドのC末端から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記の配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-Pro-Ser-

(5) 该定常領域ポリペプチドが下記のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ser-Thr-Thr-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Asp  
 -Pro-Ser-Cys-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Ser-Thr-Val  
 -Ala-Leu-Ala-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Phe-Pro  
 -Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ser  
 -Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ser-Asp  
 -Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser  
 -Met-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Arg-Trp-Ser-Ser  
 -Glu-Thr-Phe-Thr-Cys-Asn-Val-Ala-His-Pro-Ala  
 -Ser-Lys-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Pro-Val-Pro-Lys  
 -Arg-Glu-Asn-Gly-Arg-Val-Pro-Arg-Pro-Pro-Asp  
 -Cys-Pro-Lys-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Met-Leu-Gly  
 -Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro  
 -Lys-Asp-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Gly  
 -Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Leu-Gly-Pro-Gly  
 -Asp-Pro-Gly-Val-Gly-Ile-Ser-Trp-Phe-Val-Asp  
 -Gly-Lys-Gly-Met-Gly-Thr-Ala-Lys-Thr-Gly-Pro  
 -Arg-Gly-Gly-Gly-Phe-Asn-Gly-Thr-Tyr-Arg-Val

-Val-Ser-Val-Lys-Pro-Ile-Gly-His-Gly-Asp-Trp  
 -Leu-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe-Thr-Cys-Lys-Val-Asn  
 -Asn-Lys-Ala-Lys-Pro-Ser-Pro-Ile-Gly-Arg-Thr  
 -Ile-Ser-Lys-Ala-Arg-Gly-Gly-Ala-His-Gly-Pro  
 -Ser-Val-Tyr-Val-Lys-Pro-Pro-Ser-Arg-Gly-Gly  
 -Leu-Ser-Lys-Asn-Thr-Val-Ser-Lys-Thr-Cys-Lys  
 -Ile-Lys-Asp-Phe-Phe-Pro-Pro-Asp-Ile-Asp-Val  
 -Gly-Trp-Gly-Ser-Asn-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly  
 -Ser-Lys-Tyr-Arg-Thr-Thr-Pro-Pro-Gly-Leu-Asp  
 -Gly-Asp-Gly-Ser-Tyr-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Lys  
 -Ser-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gly-Arg-Gly-Asp  
 -Thr-Phe-Ile-Cys-Ala-Val-His-His-Gly-Ala-Leu  
 -His-Asn-His-Tyr-Thr-Gly-Lys-Ser-Leu-Ser-His  
 -Ser-Pro-Gly-Lys

(6) 記載第(1)項から第(6)項のいずれかに記載のイヌ免疫グロブリンの定常領域をコードする遺伝子断片をマウス免疫グロブリンH鎖の可変領域をコードする遺伝子断片の3'端に接続したことを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖をコードする組換えDNA分子。

(7) 記載第(6)項記載の組換えDNA分子を発現ベクターに組み込み、この組換えベクターによって原核細胞された毛虫を培養し、発現されたマウス×イヌキメラ抗体H鎖を回収することを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製法。

(8) 記載第(7)項記載のマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製法により得られるマウス×イヌキメラ抗体。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 医療上の利用分野

本発明は、イヌの疾患、特に伝染病の診断、治療及び予防に用い得る有用なイヌモノクローナル抗体に関する。さらに本発明にはイヌモノクローナル抗体を構成するイヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびこれを用いたマウス×イヌキメラ抗体に関する。

#### 発明の意義

イヌはペットとして昔から人間に愛着のある動物であるが、近年の歐米では、「伴侶、仲間、精神としての動物」(Companion species)と称され、人間社会の一員としての地位を確立しつつある。

もう一方では、医学、薬学、畜医学から心理学にいたる実験動物としての貴重度は更に大きなものであったが、近年では医薬品の効能検定や安全性試験にSPFイヌなどの呼称のもとで更に貴重度が高まっている。いずれの場合にも当然の事として、これらのイヌの疾患、特に伝染病に関するより確実な知識がますます必要となり、その診断、治療、予防のための方法が確立される事が要求されている。

イヌのウイルス性疾患は多く、なかでもイヌジストンバーウイルス、イヌバルボウイルス、イヌ伝染性肝炎ウイルス等の疾患は急性で致死率が高い。予防としてのワクチンは開発されているものの、感染・発症したイヌの治療法としては、抗生素、サルファ剤等の二次細胞感染予防の対応療法しかないと。現在の治療法には問題を残している。従来より治療法として高免疫血清や血清由来の免疫グロブリンが使用され有効な実績を残してきた。しかし、現在では、動物愛護思想の高まりと共に、イヌ血清蛋白の入手が困難になり

この治療法は使いたくとも使用できない状況になっている。従って、従来の高免疫血清に代わって感染ウイルスを中和できるモノクローナル抗体が出来れば、これらウイルス性疾患の治療に大きく貢献することが可能である。

#### 既存技術

上記のような高免疫血清の代替品として、ウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでに主としてマウス型モノクローナル抗体において確立されている。ハイブリドーマ等の細胞が產生するモノクローナル抗体は大量にしかし半永久に得られ、原代不足の問題を解消できる。しかし、ここにおけるモノクローナル抗体は、副作用(マウスモノクローナル抗体をイヌに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血栓病などの副作用を起こすことが考えられる)をなくす意味から、従来のマウスモノクローナル抗体ではなくイヌモノクローナル抗体でなければならない。

これらのイヌウイルス性疾患の治療薬としてのイヌモノクローナル抗体の作製法には次のようなものが考えられる。 (1)イヌ×イヌハイブリドーマを用いる方法。 (2)ある種のウイルス及び化学薬剤等でトランスフォームさせたイヌリンパ球を用いる方法。 (3)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを用いる方法。 (4)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを親株としたイヌ×(イヌ×マウス)ハイブリドーマを用いる方法。 (5)キメラモノクローナル抗体(抗原と結合する可変(V)領域はウイルス中和活性を有するマウスモノクローナル抗体から、抗原性あるいは免疫原性及び生物学活性に固有する定常(C)領域はイヌモノクローナル抗体からなる。マウス(V)-イヌ(C)キメラモノクローナル抗体)を遺伝子組換えで作製する方法、等であるが、これらの方針による成功例は一切報告されていない。

ここで、(1)については融合効率が低いことや適当なミエローマ細胞がないこと、(2)についてはヒトの場合の即ウイルスに相当する適当なウイルスや適当な化学薬剤がないこと、さらに、(3)(4)の

方法ではヒト型モノクローナル抗体作製法から考えて、目的のイヌ型モノクローナル抗体を高効率に得るまでには多くの困難が予想される(例えば、変異性の問題等)。従って、(5)のキメラモノクローナル抗体法がより実現性の高い方法であると考えられる。

このキメラモノクローナル抗体は、可変(V)領域の原種となるマウスモノクローナル抗体を産生するマウス×マウスハイブリドーマからクローニングしたそのV遺伝子と、定常(C)領域となるイヌモノクローナル抗体を産生するイヌ抗体産生細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-イヌ(C)キメラ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターを、動物細胞(例えば、マウスミエローマ)細胞中で発現させ、その培養上清中に得られるものである。ヒトにおいてはすでにキメラ抗体に関するいくつかの報告が見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-47500号)。

このようにイヌキメラ抗体の作製には、目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変(V)領域のアミ

ノ酸配列をコードする遺伝子とイヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子が必要となる。キメラ抗体の可変(V)領域遺伝子は、前述した種々のイヌウイルス等に対して中和活性を有するマウスモノクローナル抗体を産生する細胞から得られるもので、この細胞は従来のマウス×マウスハイブリドーマ法で比較的容易に作製することが出来る。しかしながら、キメラ抗体の定常領域遺伝子となるイヌ免疫グロブリンC領域遺伝子については現在のところ全くその構造が明らかでおらず、遺伝子もクローニングされていない。従って、イヌキメラ抗体を作製するためには、イヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっている。

#### 発明の目的

このような状況にあって、本発明者は、イヌ免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列をコードしている遺伝子を早期すべく研究を重ねた結果、これを解明することに成功した。すなわち、本発

明は、これまでに一切報告されていないイヌ免疫グロブリンC領域の定常領域をコードする遺伝子を発見するものであり、これによりイヌキメラ抗体の作製を可能にするものである。本発明のイヌ免疫グロブリンC領域をコードする遺伝子を用いて作られたイヌキメラ抗体は、イヌの疾患、特に伝染病に対して副作用のない治療薬、治療薬・予防薬への応用を可能にするものである。

#### 発明の構成及び効果

免疫グロブリンのC型としては、すでにヒト及びマウス(例えば、A. Shulmanら, Cell, 29, p121 (1982); H. Takabayashiら, Cell, 29, p671 (1982))で発見され、さらに、他の動物細胞のC型では、ウサギ[C. L. Harriesら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, p6018 (1982)], ウシ[E. L. Knightら, J. Immunol., 140, p3654 (1988)]等が報告されているが、イヌ免疫グロブリンC型に関する報告はまだない。

本発明者は、イヌ肝臓細胞の染色体DNAから、ヒト免疫グロブリン遺伝子をアローブとして用い、

イヌ免疫グロブリン定常領域をコードすると思われる遺伝子断片を得ることに成功した。クローニングされた遺伝子断片の塩基配列から予測されるアミノ酸配列と、他の動物種の免疫グロブリンのC領域遺伝子の配列とを比較し遺伝子解析を行った結果、本発明により得られた遺伝子断片は、 $\alpha$ 鎖に属する免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子断片であることが判明した。

得られたイヌ免疫グロブリンA固定常領域をコードするDNA断片の塩基配列を解析し、固定常領域のアミノ酸配列を見いだし、これをこれまでに報告されているヒト、マウス、ウサギ等の免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列と比較検討したところ、イヌ免疫グロブリンA固定常領域に特異的なアミノ酸配列として、 $\alpha$ 鎖固定常領域のCB3ドメインのC末端部から最初のシスティンの近傍のアミノ酸配列が下記(A)のアミノ酸配列であることが見いだされた。

(A) -Ile-Cys-Ala-

本発明者は、本発明により解析されたイヌの

免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列、およびこれまでに解析されている他の動物の免疫グロブリンA固定常領域のアミノ酸配列を比較することにより、上記のシスティンの近傍に存在する-Ile-Cys-Ala-の領域は、イヌ、マウス、ヒト等の種の違いによっていずれも異なるアミノ酸配列となっている領域であることを見いだした。また、同時にこの領域は、例えばヒトの $\alpha$ 鎖固定常領域のアミノ酸配列としては、サブクラス間で極めてよく保存されていることも見いだし、今回本発明により明らかにされた上記の配列は、イヌ免疫グロブリンA固定常領域特有の配列であると確認された。

また、CB3ドメインのN末端部から3番目のアミノ酸から始まる配列にも、同様なイヌ免疫グロブリンA固定常領域特有の下記(B)の配列を見いだした。

(B)-Ala-Ile-Cys-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

尚、本発明においてクローニングされたこの遺

域のアミノ酸配列は下記の通りであり、このアミノ酸配列(B)がイヌ免疫グロブリンA固定常領域に存在する特有のアミノ酸配列の特徴として示される。

(B)'-Ala-Ile-Cys-Pro-Ser-

本発明のイヌ免疫グロブリンA固定常領域をコードする遺伝子断片においても、上記(A)および(B)のアミノ酸配列をコードするDNA配列をその一部に示すことを特徴とする。このような上記の $\alpha$ 鎖に含まれるアミノ酸配列は、イヌ免疫グロブリンA鎖のC領域を決定する重要なアミノ酸配列を含む。本発明により初めて明らかにされた。

これらのアミノ酸配列を含んだイヌ免疫グロブリンA固定常の特徴として示すと、下記に示すアミノ酸配列が挙げられる。

Ser-Thr-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Asp-Pro-Ser-Cys-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Ser-Thr-Val-Ala-Leu-Ala-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Tyr-Asp-Ser-Gly-Ser-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ser-Asp-Leu-Gly-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-His-Val-Thr-Val

Pro-Ser-Ser-Arg-Trp-Ser-Ser-Glu-Thr-Phe-Thr-Cys-Asn-Val-Ala-His-Pro-Ala-Ser-Lys-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Pro-Val-Pro-Lys-Arg-Gly-Asn-Gly-Arg-Val-Pro-Arg-Pro-Pro-Asp-Cys-Pro-Lys-Cys-Pro-Ala-Pro-Gly-Nle-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Gly-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Leu-Gly-Pro-Gly-Asp-Pro-Gly-Val-Gly-Ile-Ser-Trp-Phe-Val-Asp-Gly-Lys-Gly-Nle-Gly-Thr-Ala-Lys-Thr-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-Gly-Phe-Asn-Gly-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Prol-Ile-Gly-His-Gly-Asp-Trp-Leu-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe-Thr-Cys-Lys-Val-Asn-Asp-Lys-Ala-Leu-Pro-Ser-Pro-Lys-Gly-Asn-Thr-Val-Ser-Lys-Ala-Arg-Gly-Gly-Ala-His-Gly-Pro-Ser-Val-Tyr-Val-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Gly-Gly-Leu-Ser-Lys-Asn-Thr-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Ile-Lys-Asp-Phe-Phe-Pro-Pro-Asp-Ile-Asp-Val-Gly-Trp-Gly-Ser-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser-Lys-Tyr-Arg-Thr-Thr-Pro-Pro-Gly-Leu-Asp-Gly-Asp-Gly-Ser-Thr-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Ser-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gly-Asp-Trp-Phe-Ile-Cys-Ala-Val-Nle-His-Gly-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gly-Lys-Ser-Leu-Ser-His-Ser-Pro-Gly-Lys

このようなアミノ酸配列もしくはこれをコード

する核酸塩配列については一切その発音例はなく、本発明により初めて開示されるものである。

また、本発明のイヌ免疫グロブリンア酸のC領域をコードする遺伝子の具体的核酸塩配列の一例としては、第5図に示された塩基配列が挙げられる。

また、本発明のγ重連伝子を用いてイヌ黒色体DNAとサインハイブリダイゼーションを行った結果、本発明のγ酸以外に、同ヒイヌ酸に属している他のサブクラスのC領域遺伝子がいくつか存在していることが示された。ヒトとマウスの例【例えば、唐水ら、Cell, 29, p121 (1982); 高橋ら、Cell, 29, p671 (1982)】からも、イヌ酸にもいくつかのサブクラスが存在すると思われる。また、イヌ酸には直接的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており【John S. Johnsonら、J. Insectol. 48, p923 (1966)】。本発明の遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。従って、本発明の遺伝子を用いて残りのサブクラスのC領域遺伝子をクローニングすることが可能であると思われる。

尚、同一のサブクラス内においても1ヶ所から数ヶ所のアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子が存在することがヒト、ウサギ等の免疫グロブリンア酸の遺伝子解析の結果から予想される。本発明のイヌ免疫グロブリンア酸定塩配列をコードする遺伝子断片は、上記のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片のみに限られず、このような部分的にアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子をも包含する。

キメラ抗体の作製方法はすでにマウス-ヒトキメラ抗体で示された方法【高辻ら、Cancer Research, 47, p999-1005 (1987)】に準じて行うことが出来る。すなわち、キメラ抗体遺伝子は、基本的にV領域遺伝子とC領域遺伝子の2種類の遺伝子断片を組合させることにより構成される。さらに、遺伝子の構成に応じて、主として2つの組合がある。すなわち、黒色体DNAから導出したVとC領域遺伝子、cDNAから導出したVとC領域遺伝子の組合である。

例えば、マウス黒色体DNAから導出したV領域遺伝子を、イヌ黒色体DNAから導出したC領域遺伝子

と組合させた場合、マウスV領域遺伝子には発現に必要なアロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を含んでいることが特徴的である。ただし、アロモーターやエンハンサー等はマウス由来である必要はなく、イヌ由来でもヒト由来でもウイルス由来でも差しつかえない。また、アロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが特徴的である。エンハンサーについては必ずしもこの位置に固定されるものではない。一方、マウスcDNAから導出したV領域遺伝子を、イヌcDNAから導出したC領域遺伝子と組合させる場合、その組合部分は適当な制御調節サイトや、必要であれば適当な組合リinkerを用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないよう、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化しないよう組合しなければならない。さらに、宿主細胞内で発現を可能にするための適当なアロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してや

る必要がある。このようにして作製したキメラ抗体遺伝子を、例えば、pSV2-gpt【R. C. Hollingshead, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, p2027 (1981)】、pSV2-neo【P. J. Southernら、J. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)】等の選択マーカーの付いた適当なベクタープラスミドに、あるいは、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス遺伝子の一部(バビローマウイルスなど)を持ったベクタープラスミドに、V領域遺伝子とC領域遺伝子プラスミドを組合することが特徴的である。マウス-イヌキメラ抗体を得るためにには、このようにして調製されたキメラ抗体遺伝子を含むプラスミドを用いて宿主細胞細胞を用意化することが必要である。宿主細胞細胞としては、不活性化されたマウス及び他の動物細胞、特ましくはマウントバク細胞(例えば、P3X63AG8-653 (ATCC CRL-1580), P3X63AG8-1 (ATCC CRL-1597), P3/BS1/1 AG4-1 (ATCC CRL18), Sp2/0-Ag12 (ATCC CRL-1581)等の原代細胞、ハイブリドーマ)である。cDNAによる

細胞の形質転換方法としては、DEAE-デキストララン法、細胞カルシウム共沈法、アロトアロスト融合法、エレクトロポレーション法等の方法【例えば、B. B. Barnesら編纂 "Transcription and Translation" IBL Press (1986) 参照】があり、いずれの方法でもよい。即ちL細胞のキメラ抗体遺伝子を同時に持つプラスミドで形質転換を行う場合には選択マーカーは1種類でよいが、2種類異なる場合には2種類のマーカーが必要である。この場合には、1つのプラスミドで形質転換を行った後に、さらにもう一方のプラスミドで形質転換を行う二重形質転換法を用いるのが好ましい。このようにして形質転換された細胞を通常のハイブリドーマと同じ方法で培養下(例えば、10%牛胎児血清を含む RPMI 1640培地)で培養すれば、この細胞から通常のハイブリドーマの產生する抗体と同時にマウス-イヌキメラ抗体が分離產生される。このキメラ抗体は通常の抗体と同様な方法により精製することができる。

本発明により提供されるイヌ免疫グロブリンを

を含むDE94テクノロジーDNA断片を切り出し、アロープとして使用した。

イヌ肝臓の染色体DNA100mgをB60Tで部分消化(100units, 37°C, 10分)した後、この18~20kbpに相当するDNA断片をしょ錠電気泳動装置(しょ錠10~40%, 1st "vol", 26000rpm, 18時間, 15°C)により調節した。次にこのDNA断片と人EMBL3ベクターDNA(ストラタジーン社製)のBaeRIの断片DNAとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、P2102大鼠(ストラタジーン)に感作させ、イヌ肝臓細胞のア膜遺伝子ライブラリを得た。このライブラリから、ヒトC<sub>4</sub>アロープを用いてブラークハイブリダイゼーション[1. D. Beeson, B. E. Davis, Science, 196, p180 (1977)]を行い、イヌC<sub>4</sub>エクソンを含むクローンDNADE94を選択した。このクローンのサイズは約20kbpで、その側鎖部の断点地図を第1図に示す。このクローンから、イヌC<sub>4</sub>エクソンを含むBaeRI-BaeRI断片DE94テクノロジー(2kbp)を分取し後の実験に用いた

コードする遺伝子断片は、イヌ免疫グロブリンA鎖のC領域の特異的アミノ酸配列もしくはDE94配列を表示するものであり、この遺伝子を用いて、上述のようにして得られるマウス-イヌキメラ抗体は、イヌの疾患に対して、これまでになかった実質的に有効な治療、予防及び治療剤となりうるものである。

次に、その実施例を示すが本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例

##### (1)ア膜遺伝子の風景

イヌア膜遺伝子をクロスハイブリダイゼーション法によりクローニングするために、まずヒトA鎖【工藤ら, Gene, 33, p181 (1989), 西村ら, Cancer Res., 47, p999 (1987)】とのクロスハイブリダイゼーションの条件を検討した。コンピュータを用いてマウス、ヒト、ウサギア膜用ホモロジー解析をした結果、特にCB2-CB3エクソンを含む領域が非常にホモロジーが高いことが示された。更って、このヒトC<sub>4</sub>遺伝子よりCB2-CB3エクソン

##### (2)DE94テクノロジーを用いたサインプロット分析

初めてこのDE94テクノロジーを用いたサインプロット分析を行った。イヌ肝臓細胞の染色体DE9418kbpを剪断装置B60Tで切断し、このDE94を電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ハイボンド-3プラス、アマシーム社製)に貼り下す。イヌC<sub>4</sub>領域を含んだ[<sup>32</sup>P]標識DE94テクノロープとサインハイブリダイゼーションを行った。サインハイブリダイゼーションの方法はハイボンド-3プラスに付属していたマニュアルのアロトコールに従った。検出されたバンドのパターンを、ヒトC<sub>4</sub>蛋白アロープを用いたクロスハイブリダイゼーションのパターンと比較した結果、全く同じ位置(2kbp)にバンドがみとめられた(第2図)。分子サイズは人ファージDNAをB11.4用で剪断したマーカーDNAによって算出した。また、2kbp以外に1.9, 1.1, 1.0kbpにもDE94テクノロジーとハイブリダイズするバンドを検出した。この結果より、このDE94テクノロジー以外に同じイヌ膜に属している他のアブクラスのC<sub>4</sub>領域

遺伝子がいくつか存在していることが示された。イヌア族には血清学的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており [John S. Johnsonら, J. Immunol., 98, p923(1966)]。DE94ア遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。

次にノーダンプロット分析を行った。イヌ脾臓ボリA+BBA(クローンテック社製)2mを乾燥試験により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ハイボンド-3アラス)に転写後、[<sup>32</sup>P]標識DE94アプローブとノーダンハイブリダイゼーションを行った。ノーダンハイブリダイゼーションの方法はハイボンド-3アラスに付属のマニュアルのアロトコールに従った。このプローブにより約1.8kbの位置にバンドが検出された(第3図)。このサイズはマウス及びヒトで知られている免疫グロブリンア族遺伝子のサイズとほぼ同じである。

これら2つの結果より、DE94アは機能的なイヌC<sub>γ</sub>遺伝子を含む活性な遺伝子であることが推定され

た。尚、このDE94アが組み込まれたアラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DCG-DE94G〔特許出願書第11466号〕として出願人により登録されている。

#### (3) DE94アの核酸塩基配列とアミノ酸配列

イヌC<sub>γ</sub>遺伝子の核酸塩基配列を調べるために、クローンDE94アから、BamHI-EcoRI, EcoRI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-BamHIの各小DNA断片を調製した。これらの各小断片をT4-DNAポリメラーゼを用いて切断基を平滑末端に変えた後、X13np19ベクターのSmaIサイトに宝ライゲーションキットを用いて挿入した。東洋紡インストラクトマニュアルの方法を使い、JM109のコンピテント細胞を調製し、C<sub>γ</sub>遺伝子を挿入したX13np19-DNAで形質転換させ、一本鎖DNAを抽出培養した。さらにこの一本鎖DNAの核酸塩基配列決定は、Seq sequencer ver.2.0 DNAシーケンスキット(United States Biochemical Corporation)を用いて行った。核酸塩基配列を行った方向は第4図に示す。核酸塩基配列決定の結果、CH1-ヒンジ-CH2-CH3からな

るイヌア遺伝子が確認された。第5図にその結果を示す。さらに、この核酸塩基配列を基に予想されるアミノ酸に変換した(第6図)。

このDE94アの核酸配列を基に遺伝子解析ソフト(Genetyx:ソフトウエア開発社製)を用いて、LASLデータベースをホモロジー検索したところ、ヒト及びマウスの免疫グロブリンア族と高いホモロジーを示し、免疫グロブリンア族遺伝子以外の遺伝子とはホモロジーは示さなかった。DE94ア遺伝子のC<sub>γ</sub>遺伝子とマウス及びヒトのC<sub>γ</sub>遺伝子をホモロジー比較すると、アミノ酸レベルでマウスア1とは61.0%, ヒトG1とは70.4%であった。

以上の結果より、DE94ア遺伝子は間違いなくイヌア族に属する遺伝子であり、マウス-イヌキメラ抗体の作用を可能にする遺伝子であると思われた。

#### (4) マウス免疫グロブリンA重鎖(V<sub>A</sub>)遺伝子の構造

既CPY抗体産生ハイブリドーマJP2(ア1.4)より染色体DNAを準備し、染色体DNA100μgを制

度断片XbaIで切断する。次にこのDNA断片とX147ベクター-DNA(ストラクタージーン)をT4-DNAリガーゼにより連結させ、JP2細胞の染色体DNAライプラリイを得た。このライプラリイから、アラーカハイブリダイゼーション法[W. D. Beat et al., E. B. Davis, Science, 196, p180 (1977)参照]によりマウスJHプローブを用いて既CPY抗体のVH遺伝子を含むクローンJP2gH211を選択した。第7図はその制限酵素切断点地図である。この遺伝子断片よりVHエクソン部分を含んだEcoRI-SacI断片を調製し、以下のイヌ-マウスキメラ抗体H遺伝子の材料とした。尚、この核イヌバルボウイルス活性を有するマウス免疫グロブリンH遺伝子のV遺伝子が組み込まれたアラスミドを有する大腸菌が、Escherichia coli NYB-JP2〔特許出願書第11167号〕として出願人により登録されている。尚、同じJP2細胞から、マウスJHプローブを用いてクローニングした既イヌバルボウイルスマウス免疫グロブリンH遺伝子のV遺伝子は、Escherichia coli NYB-JP2〔特許出願書第

第11165号]として出願人により著述されている。  
(3)マウス-イヌキメラ嵌合H座遺伝子(pSV2-PBDC  
Cr)の作製

(1)で得られたプラスミドpDE94CrをBamHIで切削し、イヌ免疫グロブリンCr遺伝子を含む211のBamHI断片を調製した。この遺伝子をBamHIで切削したpSV2-gptベクターとともに主ライゲーションキットを用いて連結し、プラスミドpSV2-DCrを得た。次に、(4)で得られたpJP2gB211のEcoRI-SacI断片の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に定め、主ライゲーションキットを用いて前述のプラスミドpSV2-DCrのBpaIサイトに挿入しプラスミドpSV2-PBDCrを作製した。(第8図)

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明においてクローニングされたイヌ免疫グロブリンCr遺伝常領域をコードする染色体DNA断片(DNaDE94a及びDE94Cr)の制限酵素切削地図を示す。

第2図は、イヌ肝臓細胞の染色体DNAを制限酵素BamHIで切削し、これをイヌCr遺伝域を含んだ(

7)の構造図を示す。

[<sup>32</sup>P]標識DE94Cr(1)及び[<sup>32</sup>P]標識ヒトCr(2)プローブとサインハイブリダイゼーションを行った結果の模式図である。

第3図は、イヌ肝臓ポリA+ RNAと[<sup>32</sup>P]標識DE94Crプローブとのノーザンハイブリダイゼーションの模式図である。

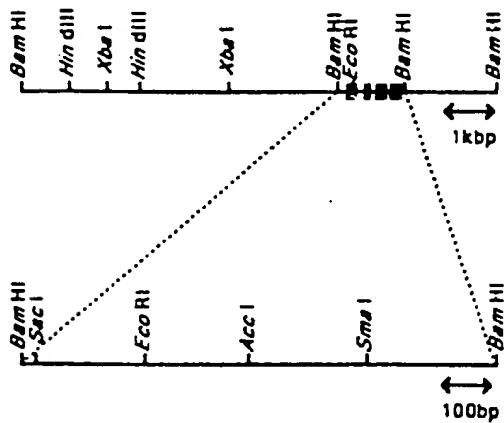
第4図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94Crの制限酵素切削地図および塩基配列解析を行った領域(一)を示す。

第5図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94Crに存在するイヌ免疫グロブリンCr遺伝常領域をコードするDNA塩基配列を示す。

第6図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94Cr中にコードされるイヌ免疫グロブリンCr遺伝常領域の全アミノ酸配列を示す。

第7図は、実施例(5)で調製した抗CPV抗体のVH領域遺伝子を含むクローンJP2gB211の制限酵素切削点地図を示す。

第8図は、実施例(6)で調製した抗CPVマウス×イヌキメラ抗体H鎖を発現する遺伝子(pSV2-PBDC



特許出願人 財團法人 化学及生物学研究所  
代理人弁理士 関井加

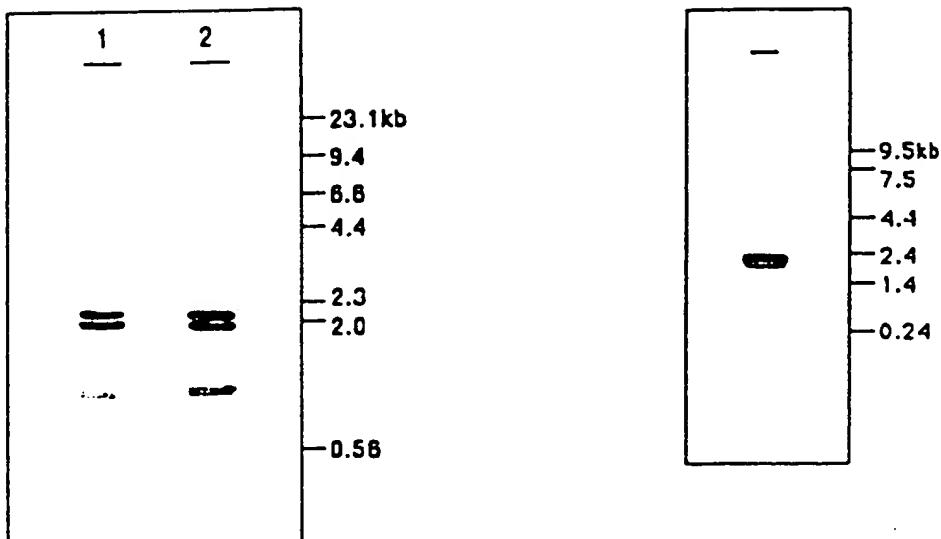


図 3

図 2



図 4

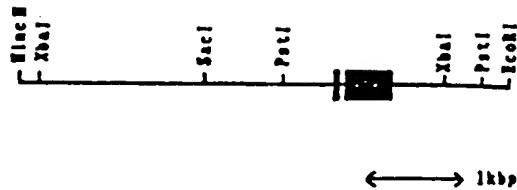
図 5

CCTCCACCAAC GGGCCCCCTCG TTTTTCACAC TGGACCCCAAG CTGGGGGTCC  
 ACTTCCGGCT CCACGGTGGC CCTGGCTGCG CTGGGTGTCAG CCTACTTCC  
 CGACCCCTGTA ACTGTGTCTT CGAATTCGGG CTCTTTGACCC AGGGGTGTGT  
 ACACCTTCCC GTCCGACCTG CAGTCTCTAGG GGTCTCTACTC CCTCAGCAGC  
 ATGGTGACAG TCCCTCTCCAG CAGGTGGTCC AGGGAGACCT TCACCTGAA  
 CCTGGGGCCAC CGGGGCGAGA AAGCTAAAGT AGACAAAGCCA CTGGCCCAAAA  
 GAGAAAATGG AAGAGTTCTT CGCCCAACTG ATTCCTCCAA ATGCCCAACTC  
 CCTGAAATGC TGGGAGGGCC TTCCGCTTTC ATCTTCCCCC CGAAACCCAA  
 GGACACCCCTC TTGATTGCCCG GAACACCTGA GGTCACTATGT GTGGTGGTGG  
 ATCTGGGACCC AGAAGACCCCT GAGGTGGAGA TCACTGGTT CGTGGACGGT  
 AAGCAGATCC AAACACCCAA GACTCAACCT CGTGAGGAGC ATTCATG  
 CACCTACCGT GTGGTCAGTG TCCCTCCCAT TGGGACCCAG GACTGGCTCA  
 AGGGGAAGCA GTTCACGTCC AAAGTCACAA ACAAAACCCCT CCCTATCCCG  
 ATCGAGAGGA CCATETCCAA GGGCAGAGGG CAGGGCCCATC AGGCCCAGCT  
 GTATGTCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGCT GAGCAAGAAAT AGAGTCAGCT  
 TGACATGCC T GATCAAAGAC TTCTTCCAC CTGACATTGA TGTGGAGTGT  
 TGGAGCAATG GAGAGCAAGA GCTTGAGAGC AAGTACCGCA CGACCCCGCC  
 CCAGCTGGAC GAGGACGGGT CCTACTTCTT GTACACCAAG CTCTCTGTG  
 ACAAGAGGGG CTGGCACCCG GAGACACCT TCATATGTGC GGTGATGCCAT  
 GAGGCTCTAC ACAACCACTA CACACAGAAA TCCCTCTCCC ATTCTCCGGG  
 TAAATGA

図6

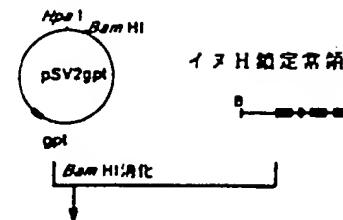
Der Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Asp Pro Ser Cys  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val  
 Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asp Ser  
 Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser Asp Leu  
 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val  
 Pro Ser Ser Arg Trp Ser Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val  
 Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro  
 Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro  
 Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Glu Pro Glu  
 Asp Pro Glu Val Glu Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu  
 Met Glu Thr Ala Lys Thr Glu Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn  
 Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Glu  
 Asp Trp Leu Lys Lys Glu Phe Thr Cys Lys Val Asn Asp  
 Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala  
 Arg Glu Glu Ala His Glu Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro  
 Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys  
 Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp  
 Glu Ser Asn Glu Glu Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr  
 Thr Pro Pro Glu Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr  
 Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Arg Gly Asp  
 Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Glu Lys \*\*\*

図7



←→ 1 kbp

イヌH鎖定常領域遺伝子



マウスH鎖可変領域遺伝子

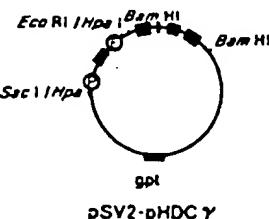
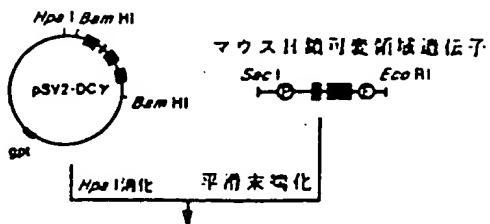


図8

第1頁の続き

◎Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号
C 12 N 15/62		
C 12 P 21/08		
# A 61 K 39/395	A F E H	8214-4B
G 01 N 33/531		8829-4C
33/577	A	7906-2J
	B	9015-2J